

Tecnica IEF

Così si identificano le specie ittiche

Il metodo può supportare sia organi di controllo sia certificatori

di **Maria Concetta Campagna***, **Nicola Bottalico***,
Giuseppe Muratore**, **Stefano Saccares****

* Mercato Ittico di Guidonia (RM)

** Istituto zooprofilattico sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

L'IEF è un metodo analitico di facile utilizzo, economico, ma soprattutto discriminante fra le specie ittiche, spesso soggetto a "frodi di sostituzione". I risultati di una ricerca

Nel panorama agroalimentare, il settore ittico figura tra i settori commerciali maggiormente soggetti a frodi di sostituzione di specie poiché contraddistinto da una diversificazione dell'offerta estremamente vasta.

Identificare le specie oggetto di frode in maniera inequivocabile e rapida è fondamentale per le implicazioni sanitarie, oltre che commerciali, connesse ad un'etichettatura non corretta. Tuttavia, l'identificazione morfologica, unica tecnica attualmente valida a livello legale in Italia, non è applicabile su prodotti ittici lavorati e trasformati, preferiti dal consumatore perché più pratici da utilizzare.

Ripetute frodi "di sostituzione" di una specie ittica pregiata con una di minor valore economico minano la fiducia dei consumatori e pos-

Tabella 1
Tracciato isoeletroforetico di *Thunnus thynnus*

TRACCIATO IEF	PUNTI ISOELETTRICI (PI) <i>THUNNUS THYNNUS</i> (TONNO ROSSO)
	7,93
	7,58
	7,36
	6,85
	6,81
	6,76

sono influire sulla sicurezza alimentare dei prodotti, che è appunto garantita principalmente dal rispetto della documentazione commerciale di accompagnamento e delle procedure di etichettatura.

La presenza di specie ittiche presenti nei nostri mercati provenienti ormai da ogni parte del mondo e l'aumento della commercializzazione di esemplari già filettati sui banchi di vendita rappresentano difficoltà spesso insormontabili per riconoscere l'origine e la provenienza dei prodotti ittici da parte dei Servizi veterinari e dei consulenti che si occupano della certifica-

zione di filiera e qualità dei prodotti alimentari tramite l'identificazione morfologica. Infatti, quasi la metà dell'attuale consumo domestico di prodotti ittici in Italia (48,6% nel 2005, dati Ismea) riguarda prodotti lavorati e trasformati, tendenza che è andata aumentando nel corso degli anni.

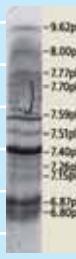
In ambito sanitario, la possibilità di identificare con sicurezza le specie potenzialmente tossiche od allergiche, oltre a quelle provenienti da areali inquinati o non controllati per la presenza di biotossine termoresistenti, assume un importante significato dal punto di vista della sicurezza alimentare.

La rintracciabilità a livello di filiera è garantita mediante l'etichettatura, disciplinata dal decreto Mipaaf del 31 gennaio 2008 relativo a modifiche ed integrazioni all'elenco delle denominazioni commerciali dei prodotti ittici, allegato al decreto ministeriale del 25 luglio 2005, comprendente la nomenclatura di ben 727 specie.

In particolare, l'identificazione di specie deve essere rivolta a tutelare il consumatore nei confronti delle specie ittiche nocive e i controlli devono essere effettuati (regolamento CE 854/2004, allegato 3, capo II) affinché non siano immessi sul mercato pesci velenosi appartenenti alle famiglie dei *Tetraodontidae* (nome scientifico dei pesci palla), *Molidae*, *Diotontidae* e *Canthigasteridae*, prodotti della pesca contenenti biotossine quali la ciguatossina (CFP) o le tetrodotossine (TTX). Le TTX possono essere contenute, oltre che dai pesci palla, anche da altri organismi marini quali: *Jania* spp, *Astropecten* spp, *Veremolpa scabra*, *Charonia sauilae*, *Rapana venosa*, *Demania toxica*, *Yongeichthys criniger* e *Hapalochlaena maculosa*. Nessuna di queste specie può essere commercializzata (il divieto in Italia risale al 1992) ed è dagli anni '80 che nel nostro Paese non vengono segnalati casi di intossicazioni ad esse collegate. Sono state invece registrate diverse segnalazioni di specie appartenenti alla famiglia dei *Tetraodontidae* e di altre specie alloctone del Mar Mediterraneo. La prima segnalazione risale al 2003 e venne effettuata dai Servizi veterinari dell'Asl di Gaeta; nel 2005, invece, si riscontra la prima segnalazione di *Lagocephalus sceleratus* nel Mar Mediterraneo; successivamente sono state ricevute segnalazioni dai mercati della Campania, della Puglia, della Sicilia e della Sardegna.

Tabella 2
Tracciato isoeletroforetico di *Thunnus albacares*

TRACCIATO IEF	PUNTI ISOELETTRICI (PI) <i>THUNNUS ALBACARES</i> (TONNO PINNE GIALLE)
	9,62
	8,00
	7,77
	7,70
	7,59
	7,51
	7,40
	7,26
	7,15
	6,87
	6,80



Con il termine "frode alimentare" si considera un atto o inganno che si configura in una diminuzione del valore della merce, economico o nutritivo, effettuato dal produttore o venditore con la modifica delle caratteristiche dell'alimento, rendendolo diverso da quello pattuito.

Motivazioni di carattere commerciale

Qualunque azione ispettiva o di vigilanza da effettuarsi sul pesce o sui prodotti della pesca presuppone, come indagine iniziale, la corretta identificazione della specie di appartenenza.

Le più comuni frodi commerciali collegate alle specie ittiche sono:

- sostituzione di specie, ovvero sostituzione di una specie pregiata con un'altra somigliante, ma di minor valore economico (tonno per calamari, melù per merluzzi, zanzette per sogliole); frequenti le frodi su

tranci e filetti;

- vendita di un prodotto della pesca scongelato per fresco;
- vendita di prodotti di allevamento per prodotti pescati;
- aumento di peso rispetto al peso originale, mediante introduzione di scaglie o pezzi di ghiaccio;
- quantità dichiarata non corrispondente al peso netto in prodotti della pesca congelati glassati.

Il veterinario ispettore è in grado di identificare il pesce intero valutando i criteri morfologici tipici della specie, ma nel caso di pesce già toelettato è necessario ricorrere al riconoscimento sulla base di indagini analitiche, come ad esempio la Focalizzazione Isoelettrica (IEF) o le tecniche di biologia molecolare. L'IEF delle proteine sarcoplasmatiche, in particolare, è una procedura elettroforetica molto diffusa, ufficialmente utilizzata in molti Paesi per scopi identificativi di specie su altre matrici alimentari. Per i prodotti trasformati – ossia sottoposti ad un'azione chimica o termica quale la cottura, l'affumicamento, la salagione, l'essiccamiento, la marinatura – devono essere applicate, invece, tecniche analitiche diverse, come l'analisi degli acidi nucleici, molecole più stabi-

li delle proteine sarcoplasmatiche, utilizzando la tecnica della Reazione a Catena della Polimerasi (PCR), sia con metodo FRLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sia con metodo *Real-Time*.

Il riconoscimento della specie può essere utile nel caso di tranci di tonni commercializzati freschi o congelati, dove il colore originale varia dal rosa chiaro dell'alalunga (*Thunnus alalunga*) al più scuro tonno rosso (*Thunnus thynnus*). Determinare la specie esatta può essere d'aiuto per capire se il colore della carne sia naturale oppure dovuta a sostanze esogene vietate in Italia, come il monossido di carbonio (CO), sostanza gassosa impiegata come additivo, che mantiene ravvivato il colore dei tessuti, fissando la carbossiemoglobina al posto dell'ossiemoglobina.

Pertanto, è importante incrementare le banche dati delle diverse specie di pesci in nostro possesso anche con i tracciati standard in Isoeletrofocalizzazione appartenenti alle specie *Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares*, *Thunnus obesus* e *Thunnus allunga*, creando una vera e propria mappa proteica specie-specifica.

Il riconoscimento della specie è utile per i tranci di tonno freschi o congelati, per capire se il colore è naturale o dovuto a sostanze esogene vietate in Italia

Materiali e metodi

L'Isoeletrofocalizzazione (IEF) è una tecnica analitica che ci permette di separare le proteine sarcoplasmatiche idrosolubili in base al loro punto Isoelettrico (pI), pH al quale la carica complessiva della proteina è nulla.

Nel nostro studio, le proteine sarcoplasmatiche sono state estratte come descritto nel metodo AOAC n. 980.16 (1990) dopodiché

TRACCIATO IEF	PUNTI ISOELETTRICI (PI) <i>THUNNUS OBESUS</i> (TONNO OBESO)
	9,5
	7,98
	7,74
	7,57
	7,52
	7,39
	7,25
	7,15
	6,86
	6,78

Tabella 4
Tracciato isoeletroforetico di *Thunnus alalunga*

TRACCIATO IEF	PUNTI ISOELETTRICI (PI) <i>THUNNUS ALALUNGA</i> (ALALUNGA)
	9,27
	7,91
	7,57
	7,51
	7,38
	7,25
	7,16
	6,73
	6,69

l'estratto proteico è stato seminato sul gel di poliacrilammide Servalyt pH 3-10.

I parametri di corsa elettroforetica sono i seguenti: $V = 2000$, $W = 24$ e $mA = 12$ per 3 h e 30 m a $T = 4^\circ C$.

A fine corsa elettroforetica il gel è stato fissato in acido tricloroacetico e colorato con *Serva blue*.

Dopo decolorazione con acido tricloroacetico ed acqua, il gel è stato posto per 1 h in soluzione di glicerolo al 10%. I gel dopo essiccazione sono stati elaborati con il densitometro GS 800 Biorad e i relativi software *Quantity One* e *FPQUEST*.

Nello studio sono state analizzate 4 diverse specie ittiche (*Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares*, *Thunnus obesus* e *Thunnus alalunga*); ogni campione è stato prelevato al mercato ittico di Guidonia, identificato morfologicamente e classificato secondo le caratteristiche tipiche della specie.

Dopodiché tutti gli esemplari sono stati fotografati ed analizzati in IEF per creare un tracciato elettroforetico standard caratteristico al fine di ampliare il database con le mappe proteiche specie-specifiche appartenenti al Tonno rosso, al Tonno a pinne gialle, al Tonno obeso e all'Alalunga, creando una carta d'identità specifica per ogni specie.

Risultati

Nelle *tabelle 1, 2, 3 e 4* sono riportati i risultati relativi alle mappe proteiche in IEF inerenti alle 4 specie ittiche oggetto dello studio.

Conclusioni

Se si osservano i tracciati IEF, si nota immediatamente il differente numero di bande significative e il range di distribuzione delle bande nel gradiente di pH. Analizzando i tracciati di ogni esemplare si può constatare che si tratta di specie-specifici, consentendo di costruire una mappa proteica caratteristica per ogni esemplare analizzato.

L'IEF è un metodo analitico di facile utilizzo, economico, ma soprattutto discriminante fra le specie ittiche; può essere utilizzato per identificare le frodi di natura commerciale ma anche di natura sanitaria in quanto il tracciato elettroforetico che si ottiene è specie-specifico e quindi caratteristico solamente di una determinata specie ittica.

Il metodo, quindi, può essere un mezzo di supporto per gli organi di controllo in fase di ispezione e può essere utilizzato nel processo di certificazione dei fornitori della grande distribuzione organizzata.

Per saperne di più

- V. Tepedino, S. Raimondi Evalli, A. Berrini, V. Borromeo, D. Gaggioli, C. Secchi, P. Manzoni. *IEF: una metodica rapida ed efficace*. EuroFishmarket, n. 2/2004, pp. 16-26.
- Metodo AOAC n. 980.16 (1990). *Identification of fish species. Thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing method. Final action. Official method of analysis*. Association of Official Analytical Chemists, 15th edition.
- R. Condoleo, S. Marozzi, M.C. Campagna, S. Saccaces. *Lotta alle attività illegali nel settore della pesca: strumenti scientifici a sostegno dell'identificazione e della tracciabilità dei prodotti ittici*. Il pesce, n. 6/2011, p. 33.